

组织无机磷含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

无机磷主要指磷酸根，参与生物体内多种代谢，包括能量代谢、核酸代谢、蛋白质磷酸化和脱磷酸化等等，此外促进碳水化合物的合成、转化和转运。

测定原理：

钼蓝与磷酸根生成 660nm 有特征吸收峰的物质，通过测定 660nm 光吸收，即可计算无机磷含量。

自备仪器和用品：

离心机、水浴锅、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前配制，加入 10 mL 蒸馏水，充分溶解后加入试剂二（全部），混匀。

标准品：液体×1 支。

无机磷提取：

按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。10000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 660 nm，蒸馏水调零。
2. 打开水浴锅，调节温度到 40℃。
3. **空白管：**取 0.5mL EP 管，依次加入 100μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
4. **标准管：**取 0.5mL EP 管，依次加入 10μL 标准液，90μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
5. **测定管：**取 0.5mL EP 管，依次加入 10μL 上清液，90μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

组织无机磷含量计算：

（1）按照蛋白含量计算

无机磷含量(μmol/mg prot) = $[C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div C_{pr}$
 $= 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$

(2) 按照样本质量计算

无机磷含量($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $[C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div W$
 $= 1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$

C 标准液: 1mmol/L; V 总: 上清液总体积, 1mL=0.001 L; W: 样品质量, g。

注意事项:

1. 试剂三需临用前配制, 并且当天使用完毕。
2. 40min 内完成比色。
3. 最低检出限为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。